

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2000年12月7日 (07.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 00/73429 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 9/54, 1/20 (SHOJI, Zenya) [JP/JP]; 〒010-0854 秋田県秋田市手形字山崎86 Akita (JP). 平野賢一 (HIRANO, Kenichi) [JP/JP]. 安藤啓一 (ANDO, Keiichi) [JP/JP]; 〒481-0041 愛知県西春日井郡西春日大字九之坪字西城屋敷51 天野製薬株式会社 中央研究所内 Aichi (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/03380
- (22) 国際出願日: 2000年5月25日 (25.05.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (74) 代理人: 弁理士 北川 治(KITAGAWA, Osamu); 〒465-0048 愛知県名古屋市名東区藤見が丘7番地 藤ヶ丘第2朝日ビル3階 北川国際特許事務所 Aichi (JP).
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平11/148770 1999年5月27日 (27.05.1999) JP (81) 指定国 (国内): US.
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 天野エンザイム株式会社 (AMANO ENZYME INC.) [JP/JP]; 〒460-8630 愛知県名古屋市中区錦一丁目2-7 Aichi (JP). (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 長野宏子 (NAGANO, Hiroko) [JP/JP]; 〒493-0001 愛知県栗原郡木曽川町黒田字地蔵西6-11-503 Aichi (JP). 庄司善哉
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ENZYME LIQUOR AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, ENZYME PREPARATION, PROTEASE PREPARATIONS AND PROTEASE-PRODUCING BACTERIUM

(54) 発明の名称: 酵素液とその製造方法、酵素剤、蛋白質分解酵素剤、蛋白質分解酵素生産菌

(57) Abstract: An enzyme liquor having a hyperthermophilic peptidase activity which is obtained by culturing *Bacillus subtilis* M2-4 strain and shows a residual activity of substantially 100 % after a heat treatment at 60 to 65 °C at pH 7 for 1 hour; an enzyme preparation obtained by separating a protease from the above enzyme liquor; and protease preparations prepared by using the enzyme liquor or the enzyme preparation as the active ingredient. The above enzyme liquor, enzyme preparation and protease preparations are excellent both in hyperthermophilic nature and an ability to degrade proteins.

(57) 要約:

パチルス・ズブチリスM2-4株を培養して取得される、pH7における60～65°Cでの1時間の熱処理に対して実質的に100%の残存活性を示す高耐熱性ペプチダーゼ活性を備える酵素液。この酵素液から酵素蛋白質を分離することにより酵素剤が得られる。これらの酵素液や酵素剤を有効成分として、蛋白質分解酵素剤を製剤することができる。これらの酵素液、酵素剤、蛋白質分解酵素剤は、高耐熱性と優れた蛋白質低分子化能力とを併せ備える。

WO 00/73429 A1

## 明 細 書

発明の名称 酵素液とその製造方法、酵素剤、蛋白質分解酵素剤、蛋白質分解酵素生産菌

## 技術分野

本発明は、酵素液とその製造方法、前記酵素液から得られる酵素剤、前記の酵素液あるいは酵素剤を有効成分として含む蛋白質分解酵素剤及び蛋白質分解酵素生産菌に関する。

## 背景技術

各種の蛋白質をペプチドあるいはアミノ酸に分解する技術は、極めて多様な産業分野において広範囲に利用されている。例えば、医療用の経腸栄養剤や食品素材としての栄養補給剤の調製に利用される。又、大豆蛋白等に含まれる難分解性蛋白質の分解効率を高めて、食品利用効率を向上させることに利用される。又、原料蛋白質からのアミノ酸調味料の製造に利用される。更に、ふくらみの増強されたパンの製造に利用される。

蛋白質を分解するに当たり、塩酸等を用いる化学的分解方法は、効率が良いとは言え、分解条件が過酷であるために好ましくない副産物を生成する懸念がある。特に食品、調味料や栄養素材等の人体に関連する産業分野においては、蛋白質をマイルドな条件で分解できる酵素分解方法が好ましく利用されている（例えば特公平7-53106号公報、特開平11-75765号公報等）。

ところで従来、上記のような目的で工業的に利用する蛋白質分解酵素は、主として各種の細菌やカビを利用して生産している。しかし一般的に、細菌から取得された蛋白質分解酵素と、カビから取得された蛋白質分解酵素とは、いずれも一長一短があると言われている。そして、工業的に利用する蛋白質分解酵素として十分に満足できる活性や安定性を備えた蛋白質分解酵素は、必ずしも得られていない。

即ち、細菌由来の蛋白質分解酵素は、通常、耐熱性に優れるが、蛋白質をアミノ酸にまで分解するペプチダーゼ活性もしくは蛋白質低分子化能力が低い。従っ

て、細菌由来の蛋白質分解酵素による分解生成物には高分子量のペプチドが多く含まれる。このため、食品素材や調味料等として苦味が強いという不具合や、栄養素材として腸からの吸収速度が遅いと言う不具合がある。又、細菌由来の蛋白質分解酵素は耐熱性に優れるとは言え、例えば60°C程度の高温度域でペプチダーゼ活性を維持する高耐熱性のものは殆ど報告されていない。

一方、カビ由来の蛋白質分解酵素は通常、ペプチダーゼ活性、ペプチド結合に対する分解特異性の広さ、蛋白質の低分子化能力等の面で優れている。しかし、耐熱性、例えば、50°Cもしくはそれ以上の中～高温度域での蛋白質分解能力、が劣る。そのために、比較的低温域で蛋白質分解工程を行うことを余儀無くされて、雑菌の繁殖を許し易かった。

このように、従来、中～高温度以上の温度域で失活しない熱安定性と、優れた蛋白質低分子化能力とを併せ持つ蛋白質分解酵素が提供されていなかった。

更に、蛋白質原料として有力な大豆等に含まれる難分解性蛋白質を有効に分解することが望まれる。そのためには、蛋白質分解酵素が、蛋白質のペプチド結合に対する分解特異性の広さを持つことが重要である。しかし、上記のような熱安定性と優れた蛋白質低分子化能力とを備えたもとの、難分解性蛋白質に対して有効な分解能力を示す蛋白質分解酵素が提供されていなかった。

#### 発明の開示

本願発明者は、モンゴル地方の伝統食品である「饅頭（マントウ）」の生地より分離したバチルス属の細菌を培養した。そして、その結果得られる酵素液が、上記のような酵素特性を示すことが分かった。

以上の発見に基づき、本発明は、中～高温度以上の温度域での熱安定性と優れた蛋白質低分子化能力とを併せ持つ蛋白質分解酵素液を提供する。更に好ましくは、同時に難分解性蛋白質を有効に分解することができる蛋白質分解酵素液を提供する。また本発明は、かかる酵素液の製造方法を提供する。また本発明は、上記酵素液から酵素蛋白質を分離して得られる酵素剤を提供する。また本発明は、前記酵素剤を有効成分として含み、一定の用途に用いられる蛋白質分解酵素剤

を提供する。更に本発明は、前記酵素液や酵素剤を製造するための蛋白質分解酵素生産菌を提供する。

本発明の酵素液は、バチルス属の細菌を培養して得られる蛋白質分解活性を示す酵素液であって、pH 7における60～65°Cでの1時間の熱処理に対して実質的に100%の残存活性を示す高耐熱性ペプチダーゼ活性を備える、酵素液である。この酵素液を用いることにより、雑菌の繁殖を許さない温度条件、例えば50°C以上、もしくは60～65°Cに至る中～高温度域で蛋白質分解工程を行うことが可能となる。しかも、ペプチダーゼ活性によって十分な蛋白質低分子化能力を期待することができる。上記ペプチダーゼ活性は、より好ましくはアミノペプチダーゼ活性である。

本発明の酵素液は、より好ましくは、更にプロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性とを併せ備えるものである。前記プロテアーゼ活性には、好適pHを中性域に持つ中性プロテアーゼ活性と、好適pHをアルカリ性域に持つアルカリ性プロテアーゼ活性とが含まれる。このような酵素液においては、更に優れた蛋白質低分子化能力と、プロテアーゼ活性の一般的な特徴である反応初速度の早さを期待することができる。従って、蛋白質分解反応の高速度化を図ることができる。更に、例えば食肉を軟化させる際、ペプチダーゼ活性やプロテアーゼ活性による肉質の軟化と、コラゲナーゼ活性による結合組織のコラーゲンの分解とが同時に進行し、食味の良い肉とすることができる。

本発明の酵素液は、更に好ましくは、下記の1)～4)の内の少なくとも一の特性を示し、その特性による併記した効果が得られるものである。

1) 蛋白質のペプチド鎖における少なくとも10種類以上のアミノ酸の結合部位を切断するペプチド分解部位特異性を示す酵素液。この広範囲なペプチド分解部位特異性に関しては、10種類以上、より好ましくは12種類のアミノ酸の結合部位をカルボキシル末端において切断するペプチド分解部位特異性が認められる。このようなアミノ酸として、具体的にはロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、リシン、バリン、アラニン、スレオニン、グリシン、セリン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンが挙げられる。

通常の蛋白質分解酵素は5, 6種類以下、多くとも10種類未満のアミノ酸の結合部位に対してペプチド分解部位特異性を示す程度である。従って、この酵素液のペプチド分解部位特異性は、非常に範囲が広い。このため、優れた蛋白質低分子化能力が担保される。又、恐らくはこの広範囲なペプチド分解部位特異性のために、従来分解することが困難とされて来た大豆等の難分解性蛋白質に対して有効な分解活性を示す。

2) 酸カゼイン1g当たりプロテアーゼ活性で200単位の前記酵素液を添加して17時間の分解を行うことにより、分子量1000以下のペプチド又はアミノ酸を前記酸カゼインに対して50重量%以上生成すると言う蛋白質低分子化能力を示す酵素液。この蛋白質低分子化能力に関して、従来の蛋白質分解酵素に比較して分子量1000以下のペプチド又はアミノ酸の生成量が著しく多いことが認められる。

このような特性の酵素液であるため、蛋白質原料から分子量1000以下のペプチド又はアミノ酸を非常に効率良く生成することができる。従って、苦味のない高品質なアミノ酸素材やアミノ酸調味料を調製することができる。又、消化管からの吸収性の良好な栄養素材を調製することができる。

3) 上記2)の蛋白質低分子化能力が、比較的中温度域に近い45°C及びかなり的高温域である60°Cの温度条件での分解において同等に示される酵素液。このような特性の酵素液であるため、蛋白質低分子化工程を雑菌の繁殖を許さない温度条件で行うことができる。

4) 大豆の難分解性蛋白質に対して、所定の作用条件において50%以上の可溶化率を示す酵素液。この難分解性蛋白質分解活性は、例えば食肉の結合組織等の他種の難分解性蛋白質に対しても有効であることを期待できる。この特性には、上記の広範囲なペプチド分解部位特異性、とりわけ、従来の蛋白質分解酵素において余り見られないグリシン、バリン、アスパラギン等のアミノ酸の結合部位に対する分解部位特異性が関与している可能性がある。

このような特性の酵素液であるため、蛋白質原料として有力である大豆を、その難分解性蛋白質も含めて、有効にアミノ酸に分解することができる。

本発明の酵素液は、バチルス属の所定の細菌を培養することにより容易かつ確

実に取得することができる。例えば、FERM BP-7155号としてブダペスト条約に基づき国際寄託されているバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) M2-4株を培養することにより取得することができる。そのための培養条件には特段の限定はなく、通常の栄養培地を用いて通常の条件で培養しても良く、必要に応じて特殊な培地や特殊な培養条件を採用しても良い。

酵素液としては、液体培地を用いて培養した場合における培地を、そのまま除菌することなく使用することもできるし、濾過や遠心分離等の手段により菌体を除菌したり固形物の排除した後の酵素液を使用することもでき、更にはこれを、限外濾過膜等を利用したマイルドな手段で濃縮した酵素液として使用することもできる。

本発明に係る以上の酵素液については、カラムクロマトグラフィにより、分子量の異なる複数種類の蛋白質分画を得ている。そして、これらの各分画に係る蛋白質を個別に分離して酵素活性試験に供することにより、酵素液中にアミノペプチダーゼ、中性プロテアーゼ、酸性プロテアーゼ及びコラゲナーゼが含まれることを確認している。従って、本発明の酵素液が示す前記の高耐熱性ペプチダーゼ活性、プロテアーゼ活性、コラゲナーゼ活性、及び上記1)～4)の特性が、これらの酵素の作用に基づくものであることは確実である。但し、上記1)～4)の個々の特性に対する各酵素の関与の種類及び度合いについては、未だ正確には確認していない。

又、本発明は、バチルス属の細菌を培養し、培養物から本発明に係る上記酵素液を取得する酵素液の製造方法を提供する。この製造方法により、上記の酵素液を容易かつ確実に取得することができる。

又、本発明は、上記酵素液から酵素蛋白質を分離して得られる酵素剤を提供する。酵素蛋白質を分離するに当たり、酵素液に対する硫酸アンモニウム（硫安）塩析や、エタノールによる沈澱等の公知の適宜な方法で蛋白質を分離できる。酵素剤は、粗酵素粉末や、その緩衝液溶液等の剤型として得ることができる。酵素剤は、酵素液に比較して高品位化できる点で有利である。これらの酵素剤は前記

酵素液と同様の酵素活性及び特性を示す。

更に、本発明は、上記酵素液あるいは酵素剤を有効成分として含み、難分解性蛋白質の分解、アミノ酸調味料の製造、パンの製造、食肉の軟化、ペプチドの製造、低アレルギー化蛋白質の製造、チーズの製造のいずれかの用途に用いる蛋白質分解酵素剤を提供する。

この蛋白質分解酵素剤は、上記各種の用途において、従来の蛋白質分解酵素剤に見られない高耐熱ペプチダーゼ活性、優れた蛋白質低分子化能力、コラゲナーゼ活性等を示す。なお、パンの製造に用いた際には、体積増加（ふくらみの増強）と言う効果を得ることができる。

更に本発明は、蛋白質分解酵素生産菌を提供する。この蛋白質分解酵素生産菌により、上記各種の酵素液、酵素剤及び蛋白質分解酵素剤の有効な製造手段が提供される。この蛋白質分解酵素生産菌は、バチルス属に属し、より好ましくはズブチリス種の細菌である。蛋白質分解酵素生産菌の最も代表的なものが、バチルス・ズブチリスM2-4株である。

バチルス・ズブチリスM2-4株は、1999年5月12日にFERM P-17388号として日本国の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（あて名：日本国茨城県つくば市東1-1-3）に寄託され、2000年5月11日に、FERM BP-7155号として、ブダペスト条約に基づく国際寄託に移管されたものである。

バチルス・ズブチリスM2-4株は、モンゴル地方の伝統的な小麦粉自然発酵食品である饅頭（マントウ）の生地より分離された複数種類の蛋白質分解酵素生産菌の内、特に実用的に優れたものであって、同定試験の結果、表1の成育状態（栄研社製普通寒天培地による30°C、48時間培養時のコロニー）を示すことが分かった。又、表2の菌学的形態が観察された。更に、表3の生理的性質を示すことが分かった。

表 1

項 目	M 2 - 4 株
形	円形
表面	滑面
周縁	全縁
隆起	扁平状
透明度	不透明
光沢	鈍光
色	黄白色〜クリーム色

表 2

項 目	培養温度	培養時間	M 2 - 4 株
細胞：形 大きさ	30℃	24時間	桿菌 2.4〜3.0×約0.8 $\mu$
運動性	25℃	24時間	周毛を有し運動する
孢子：形 孢子嚢の膨張 孢子の位置	30℃	48時間	橢円形 膨らまない 中央又は準端立〜端立



表 3

項 目	M2-4株	項 目	M2-4株
グラム染色	+	フェニルアラニンアミナーゼ	-
カタラーゼ	+	硝酸塩の還元性	+
嫌氣的生育	-	イントールの生成	-
Voges-Proskauer反応	+	グルコース添加培地の の黒色色素	+
V-P7.0のpH: < 6	+	生育 pH 6.8	+
> 7	-	5.7	+
酸の生成 D-グルコース	+	食塩培地における生育 2% 5% 7% 10%	+
L-アラビノース	+		+
D-キシロース	+		+
D-マニトール	+		+
グルコースからのガス生成	-	生育温度 5℃ 10℃ 30℃ 40℃ 50℃ 55℃	-
分解 カゼイン	+		-
セリン	+		+
デンプン	+		+
利用性 クエン酸	+		+
プロピオン酸	-		+
チロシンの分解	-		-
卵黄反応	-		-

以上の根拠から、上記菌株をバチルス・ズブチリス (Bacillus subtilis) と同定し、「バチルス・ズブチリスM2-4株」と命名した。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、酵素のペプチド分解部位特異性を示す一覧図である。第2図は、実施例に係るクロマトグラフ図である。第3図は、酵素の熱安定性を示すグラフ図である。第4図は、分解反応物の分子量分布を示すグラフ図である。第5図は、分解反応物の分子量分布を示すグラフ図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を実施するための最良の形態を比較例と共に説明する。本発明

は、これらの実施の形態に限定されるものではない。

〔実施例 1：酵素液の調製と内容分析〕

1%のグルコース、1%のペプトン、0.3%のゼラチン、0.1%の酵母エキス、0.7%のリン酸2カリウム、0.1%のリン酸1カリウム、0.05%のクエン酸及び0.01%の硫酸マグネシウムから組成される培地を準備した。この培地を500mL容の坂口フラスコに100mL入れて、120°Cで20分間殺菌した。その後、この培地にバチルス・ズブチリスM2-4株を接種し、30°Cで40時間の振盪培養を行った。振盪培養の後、フラスコの培養液を遠心分離して除菌を行い、粗酵素液を得た。

上記粗酵素液について、「DEAEセファロースCL6B」のカラムクロマトグラフィを行った。その結果、図2に示すように、蛋白質を示す分子量の抽出フラクションにA～Hの複数のピークが認められた。

上記各ピークに相当するフラクションを個別に回収して各種の酵素活性試験に供した。その結果、ピークBの回収液にはコラゲナーゼが含まれることを確認した。ピークC及びピークDの回収液にはアルカリ性プロテアーゼが含まれることを確認した。ピークE及びピークFの回収液にはアミノペプチダーゼが含まれることを確認した。ピークG及びピークHの回収液には中性プロテアーゼが含まれることを確認した。上記の酵素活性は、それぞれ次の方法によって測定した。

プロテアーゼ活性：1mLの0.75%のミルクカゼイン溶液（pH7.0）に1mLのピークフラクション回収液を加え、37°Cで60分間の反応を行う。その後、2mLの0.4Mトリクロロ酢酸溶液を添加して酵素反応を停止させる。この溶液を37°Cで25分間静置した後に濾紙で濾過する。別に調製した5mLの0.4M炭酸ナトリウム溶液に、上記した濾液を1mL添加し、更に1mLのフォーリン試液（和光純薬製）を加えて、37°Cで20分間静置する。この液について660nmでの吸光度を測定する。盲験として、上記操作法において、2mLの0.4Mトリクロロ酢酸溶液の添加後に1mLのフラクション回収液を加える順序で反応を行う。なお、上記反応条件下において、濾液中に0.1mgのチロシン相当量のアミノ酸を生成させる活性を1単位とする。

コラゲナーゼ活性：0.4 mLの2.5%のコラーゲン溶液（pH 7.5）に0.1 mLのフラクション回収液を加え、30°Cで30分間の反応を行う。その後、0.5 mLの0.1 M酢酸溶液を添加する。この溶液を遠心分離して上清を取得する。この上清液0.1 mLに0.9 mLのクエン酸緩衝液（pH 5）、0.1 mLの塩化スズ溶液及び2 mLのニンヒドリン溶液を添加して沸騰水中で20分間加熱する。その後、水を添加して10 mLとし、570 nmでの吸光度を測定する。盲験として、沸騰水中で5分間加熱処理をしたピークフラクション回収液を使用して、同一の測定操作を行う。なお、上記反応条件下において1分間に1マイクロモルのチロシン相当量のアミノ酸を生成させる活性を1単位とする。

アミノペプチダーゼ活性：0.8 mLのロイシン-p-ニトロアニリド溶液（0.072%）に0.1 Mトリス緩衝液（pH 7.0）を加え、更に0.2 mLのピークフラクション回収液を添加して、37°Cで60分間の反応を行う。その後、2 mLの0.7%塩酸/エタノール溶液を添加し、次いで2 mLの0.06% p-ジメチルアミノ・ケイ皮アルデヒド溶液を加える。そして10分後に540 nmでの吸光度を測定する。盲験として、沸騰水中で5分間加熱処理をしたピークフラクション回収液を使用して、同一の測定操作を行う。なお、上記反応条件下において1分間に1マイクロモルのロイシンを生成させる活性を1単位とする。

又、上記各ピークに相当するフラクション回収液の内、ピークE及びピークFの回収液については、分画分子量3000のUF膜（アミコン社製のミニタンプレート）を用いて濃縮を行い、アミノペプチダーゼの熱安定性を評価した。その結果、図3に示すように、pH 7における40～65°Cの各温度域での1時間の熱処理に対して、いずれもほぼ100%の残存活性を示すと言う高耐熱性を確認した。

#### 〔実施例2：濃縮酵素液の調製〕

実施例1と同じ組成の培地を各100 mL入れた20本の坂口フラスコに、それぞれバチルス・ズブチリスM2-4株を接種した。そして実施例1と同じ条件で振盪培養し、次いで遠心分離により除菌して粗酵素液を得た後、これらの粗酵

素液を一緒にした（合計量約 1900 mL）。この粗酵素液において、中性プロテアーゼ活性は 11.0 u/mL、アルカリ性プロテアーゼ活性は 12.1 u/mL、コラゲナーゼ活性は 4.4 u/mL、アミノペプチダーゼ活性は 0.48 u/mL であった。

次に、上記の粗酵素液約 1900 mL をアミコン社製のミニタンプレート（分画分子量 3000）の膜を用いて濃縮し、濃縮酵素液約 90 mL を得た。この濃縮酵素液において、中性プロテアーゼ活性は 166 u/mL、アルカリ性プロテアーゼ活性は 180 u/mL、コラゲナーゼ活性は 66.4 u/mL、アミノペプチダーゼ活性は 5.9 u/mL であった。

#### 【実施例 3：酵素剤の調製】

実施例 1 と同じ組成の培地 20 L を 30 L 容のジャーファーマンターに収容した。そして 30°C、回転数 250 rpm、通気量 20 L/分の条件でバチルス・ズブチリス M2-4 株を 40 時間培養した。

培養後、遠心分離により 18 L の除菌液を得て、これを旭化成（株）製の UF 膜（分画分子量 13000）で 900 mL に濃縮した。この濃縮液を硫酸 0.8 飽和で塩析を行い、生成した沈澱を凍結乾燥して、75 g の粗酵素粉末からなる酵素剤を得た。

この酵素剤の酵素活性は、中性プロテアーゼ活性が 1992 u/mL、アルカリ性プロテアーゼ活性が 2200 u/mL、コラゲナーゼ活性が 790 u/mL、アミノペプチダーゼ活性が 71 u/mL であった。

#### 【実施例 4：蛋白質低分子化能力】

pH 7 の 1% 酸カゼイン溶液に対して、実施例 3 で調製した酵素剤を、酸カゼイン 1 g 当たり pH 7 のプロテアーゼ活性で 200 単位添加となるように添加した。又、比較対照として、バチルス・ズブチリス起源の中性プロテアーゼである「プロテアーゼ N」（天野製薬（株）製）を、酸カゼイン 1 g 当たり pH 7 のプロテアーゼ活性で 200 単位添加となるように添加した。更に、バチルス・ズブチリス起源のアルカリ性プロテアーゼである「プロレザー」（天野製薬（株）製）を、酸カゼイン 1 g 当たり pH 7 のプロテアーゼ活性で 200 単位添加となるように添加した。上記の各酵素添加液を 45°C で 17 時間分解反応させ、反応

物の分子量分布を測定した。

この測定はゲル濾過法で行い、Amersham 社製の FPLC システムにより、分析カラムは Amersham 社製の「スーパーロース 12」を用いた。又、分子量の標準物質として、血清アルブミン（分子量 67000）、キモトリプシノーゲン（分子量 25000）、チトクローム C（分子量 12300）、トリプシンインヒビター（分子量 6500）及びバシトラシン（分子量 1450）を使用した。

実施例に係る酵素剤についての測定結果を図 4（a）に、プロレザーについての測定結果を図 4（b）に、プロテアーゼ N についての測定結果を図 4（c）にそれぞれ示す。

図 4（b）及び図 4（c）より明らかなように、プロレザー及びプロテアーゼ N による分解ペプチドには、分子量が 1000 超～10000 の高分子量ペプチドが多く、分子量 1000 以下の低分子量ペプチドが少なかった。そして、高分子量ペプチド（X）の低分子量ペプチド（Y）に対する量比  $X/Y$  は、いずれも約 4 以上であった。

一方、図 4（a）より分かるように、実施例に係る酵素剤による分解ペプチドでは、分子量 1000 以下の低分子量ペプチドが大半を占めた。そして高分子量ペプチド（X）の低分子量ペプチド（Y）に対する量比  $X/Y$  は 0.7 以下であって、図 4（b）及び図 4（c）の結果とは顕著な差異を示した。

分子量 1000 以下の低分子量ペプチドは、消化管からの吸収速度が早く、医療用の経腸栄養剤や食品素材たる栄養補給剤として有効であると言われている。実施例に係る酵素剤を用いて得られたペプチドは、このような目的に適う。

#### 〔実施例 5：高温度域での蛋白質低分子化能力〕

pH 7 の 1% 酸カゼイン溶液に対して、実施例 3 で調製した酵素剤を、酸カゼイン 1 g 当たり pH 7 のプロテアーゼ活性で 200 単位添加となるように添加した。又、比較対照として、アスパーギルス・オリゼー（*Aspergillus oryzae*）起源の中性プロテアーゼである「プロテアーゼ A」（天野製薬（株）製）を、酸カゼイン 1 g 当たり pH 7 のプロテアーゼ活性で 200 単位添加となるように添加した。これらの酵素添加液を 45°C 及び 60°C でそれぞれ 17 時間分解反応させて、反応物の分子量分布を測定した。測定法は実施例 4 と同様である。

実施例に係る酵素剤について、45°Cにおける分解の場合の測定結果を図5(a)に、同60°Cにおける分解の場合の測定結果を図5(b)に示す。プロテアーゼAについて、45°Cにおける分解の場合の測定結果を図5(c)に、同60°Cにおける分解の場合の測定結果を図5(d)に、それぞれ示す。

プロテアーゼAによる分解ペプチドには、図5(c)より明らかなように、45°Cにおける分解の場合にも実施例4と同様に高分子量ペプチドが多い傾向が認められる。しかし図5(d)に見られるように、60°Cにおける分解の場合にはこの傾向が一層顕著になり、高温度域におけるプロテアーゼAのかんりの活性低下が推測される。

一方、図5(a)及び図5(b)より分かるように、実施例に係る酵素剤による分解ペプチドでは、60°Cにおける分解の場合にも45°Cにおける分解の場合とほぼ同等の結果が得られた。即ち、分子量1000以下の低分子量ペプチドが大半を占めており、優れた低分子化能力と同時に高耐熱性が裏付けられた。

従って、実施例に係る酵素剤を用いて工業的スケールでペプチドを製造する際、雑菌の繁殖による微生物汚染を生じ得る50°C以下での分解操作を回避して、55°C以上(例えば、60°C)での工程管理が可能となる。このため、大きな工業的利点を得られる。

#### [実施例6：難分解性蛋白質の分解]

市販の分離大豆蛋白質である不二製油(株)製の「ニューフジプロR」100gを1000mLの水に溶解した。この溶液に前記「プロレザー」及び「プロテアーゼA」各1gを添加して、50°Cで17時間の分解反応を行った。その後、分解液を遠心分離して上記プロテアーゼ剤で分解できなかった沈澱物を分離、乾燥して、水に不溶の25gの難分解性物質を取得した。

この難分解性物質についてケルダール法で蛋白質の定量を行った処、難分解性物質中に20重量%の蛋白質が含まれていた。上記乾燥した難分解性物質5gを100mLの水に懸濁し、前記実施例1で得た粗酵素液6mLを添加して、50°Cで17時間の分解反応を行った。

又、比較対照として、上記と同様に調製した難分解性物質の懸濁液の各100mLに対して、プロレザー0.1gを添加したものを準備した。又、同様にして

、プロテアーゼA0.1gを添加したのもも準備した。これらについても、上記と同条件で分解反応を行った。

上記の各例につき、分解反応終了後に遠心分離を行い、上清液の蛋白量をケルダール法で定量し、難分解性蛋白質の可溶化率を算出した。その結果、プロレザーによる分解例では5%、プロテアーゼAによる分解例では4%の可溶化率であった。一方、実施例に係る粗酵素液による分解例では、70%の可溶化率であった。

従って、実施例に係る粗酵素液を用いることにより、難分解性蛋白質を含む蛋白質原料を用いるペプチドもしくはアミノ酸の製造において、難分解性蛋白質を有効に分解できる。その結果、ペプチドの収率を向上させ、廃棄物量を低減させることができる。

#### 〔実施例7：ペプチド分解部位特異性〕

pH7の1%酸カゼイン溶液に対して、実施例3で調製した酵素剤と、比較対照としてのプロレザー及びプロテアーゼNとを、適宜な同一単位量添加して分解反応を行った。その後、各例の分解反応液に酵母カルボキシペプチダーゼYを添加して遊離アミノ酸を分析することにより、分解されたペプチドのカルボキシル末端を推定した。

その結果、図1の該当欄において矢印で示すように、プロテアーゼNはロイシン、フェニルアラニン及びスレオニンの3種のアミノ酸のカルボキシル側を切断した。、プロレザーはロイシン、フェニルアラニン、リシン、アラニン、セリン及びグルタミンの6種のアミノ酸のカルボキシル側を切断した。一方、「M2-4」と表記する実施例に係る酵素剤は、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、リシン、バリン、アラニン、スレオニン、グリシン、セリン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンの12種のアミノ酸のカルボキシル側を切断した。即ち、実施例に係る酵素剤は、非常に広範囲にわたるペプチド分解部位特異性を示す事が分かった。

本発明の酵素液や酵素剤が発現する優れた蛋白質低分子化能力や、難分解性蛋白質に対する分解力には、上記の広範囲にわたるペプチド分解部位特異性が関係しているものと考えられる。

## 〔実施例 8 : アミノ酸調味料の製造〕

pH 7 の 10% 酸カゼイン溶液に対して、実施例 3 で調製した酵素剤と、比較対照としてのプロレザー及びプロテアーゼ A を、それぞれ酸カゼイン 1 g 当たり pH 7 のプロテアーゼ活性で 200 単位添加となるように添加した。そして、55°C でそれぞれ 17 時間分解反応を行った後、遠心分離した上清についてアミノ酸分析及び呈味の官能評価を行った。

プロレザーによる分解例では、上清液における遊離アミノ酸の生成量が 15% であり、苦味があり、旨味に欠けていた。プロテアーゼ A による分解例では、上清液における遊離アミノ酸の生成量が 36% であったが、やや苦味があり、やはり旨味に欠けていた。一方、実施例に係る酵素剤による分解例では、上清液における遊離アミノ酸の生成量が 46% に達し、呈味性に優れていた。

## 〔実施例 9 : 中華饅頭の製造〕

100 g の強力粉及び 100 g の薄力粉に 10 g の砂糖及び 1 g の食塩を添加混合し、これに 30°C の温湯を 105 mL 添加して、良く混合した。この混合物に、実施例 1 で調製した粗酵素液 2.0 mL 及び市販のパン酵母（オリエンタル酵母工業（株）製）を 4 g 添加して、30°C で 4 時間の 1 次発酵を行った。次に混合物を 20 g ずつに分割して成形し、30°C で 4 時間の 2 次発酵を行った。その後、沸騰湯浴上で 6 分間蒸して、中華饅頭とした。

対照として、上記混合物に上記市販のパン酵母（オリエンタル酵母工業（株）製）のみを 4 g 添加して、同様の方法にて中華饅頭を調製した。

調製した実施例及び対照に係る中華饅頭の体積を測定した処、実施例に係る酵素液添加の中華饅頭は、対照に係る酵素液無添加の中華饅頭に比較して、約 15% の体積増加が認められた。

## 〔実施例 10 : パンの製造〕

100 g の小麦粉、50 g の砂糖、20 g の食塩、40 g のショートニング及び 30 g の市販パン酵母（オリエンタル酵母工業（株）製）を混合した。それに水 690 mL と実施例 1 で調製した粗酵素液 50 mL を添加して、27~29°C で混練りを行った。そして 30 分間の 1 次発酵後に、450 g ずつに分割し、30 分間の 2 次発酵を行った。これを食パンケースに入れ、230°C で 25 分



間の焼成を行った。

対照として、上記酵素液無添加のものを、上記と同様の方法で1次発酵、2次発酵及び焼成した。

調製した実施例及び対照に係るパンの体積を測定した処、実施例に係る酵素液添加のパンは、対照に係る酵素液無添加のパンに比較して、約10%の体積増加が認められた。

〔実施例11：酵母エキスへの利用〕

市販の乾燥パン酵母（オリエンタル酵母工業製）100gに水を加えて1Lとした。これを2モルの塩酸溶液にてpH7に調整した後、90°Cで30分間加熱を行った。この溶液に溶菌酵素「YL-15」（天野製薬製）を1g添加して、攪拌しつつ50°Cで16時間の反応を行った。その後、90°Cで20分間加熱を行うことにより、酵母菌体を溶菌してエキスを抽出した。抽出液の遠心分離を行い、上清液を凍結乾燥して70gの酵母エキス粉末を得た。本粉末中の蛋白質の含有量は35%であった。

得られた酵母エキス粉末7gを100mLの水に溶解すると共に2モルの塩酸溶液にてpH7に調整した酵母エキス溶液を準備した。この酵母エキス溶液を用いて、本発明の酵素剤による遊離アミノ酸の生成率を試験した。その際、対照として、前記プロテアーゼN「アマノ」を用いて同様の試験を行った。

即ち、上記エキス溶液に所定単位の本発明の酵素剤又はプロテアーゼN「アマノ」を添加した後、50°Cで17時間反応させ、90°Cで20分間加熱を行った。得られた酵素処理溶液についてアミノ酸分析を行い、遊離アミノ酸生成率を算出した。なお、酵素剤の添加量は酵母エキス粉末1g当たりのプロテアーゼ活性として表示した。

本発明の酵素剤と対照酵素剤であるプロテアーゼN「アマノ」との比較結果を表4に示した。表4より明らかなように、本発明の酵素剤による処理群は遊離アミノ酸の生成率が高く、かつ呈味性に優れ、苦味がなく酵母エキスとして優れた特色を有していた。

表 4

酵素添加活性	本発明の酵素剤		プロテアーゼN「アマノ」	
	遊離アミノ酸率 (%)	風味	遊離アミノ酸率 (%)	風味
100単位	60%	旨味・苦味無し	20%	強い苦味
200	68	同上	28	強い苦味
300	70	同上	30	強い苦味

## 産業上の利用可能性

以上のように、パチルス・ズブチリスM2-4株を培養して取得される本発明の酵素液や酵素製剤は、耐熱性、蛋白質低分子化能力及び難分解性蛋白質の分解能力に優れるので、アミノ酸調味料の製造、パンの製造、食肉の軟化、大豆蛋白質の分解等に好適に用いられる。

## 請 求 の 範 囲

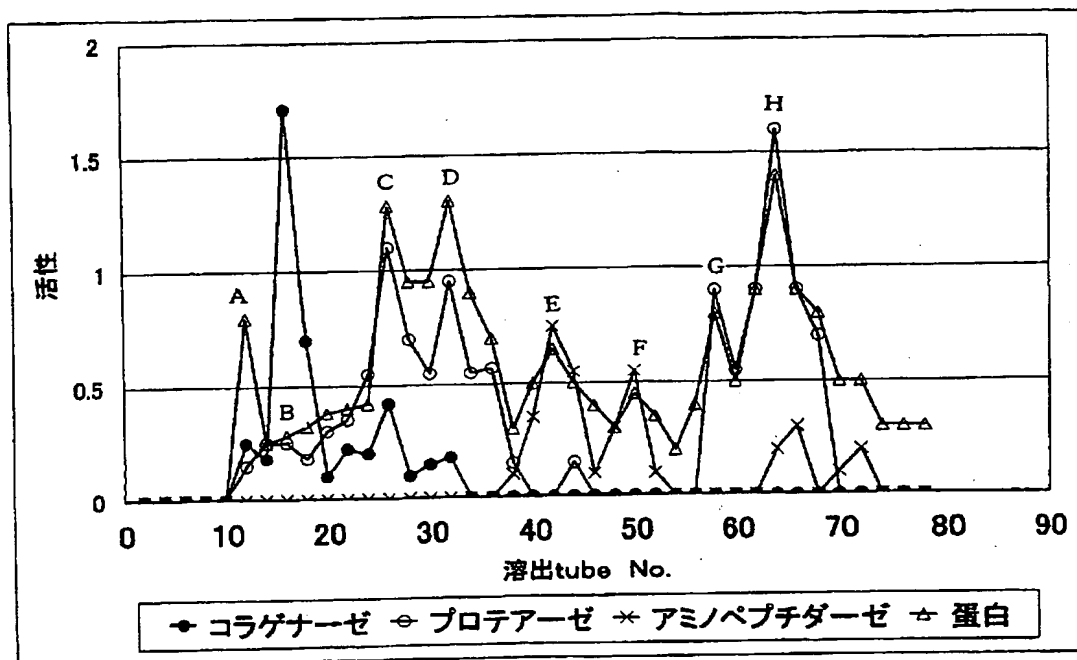
1. バチルス属の細菌を培養して得られる蛋白質分解活性を示す酵素液であって、pH 7における60～65°Cでの1時間の熱処理に対して実質的に100%の残存活性を示す高耐熱性ペプチダーゼ活性を備える酵素液。
2. 更にプロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性とを併せ備える請求の範囲第1項記載の酵素液。
3. バチルス属の細菌を培養し、培養物から請求の範囲第1項又は第2項記載の酵素液を取得する酵素液の製造方法。
4. 請求の範囲第3項に記載の酵素液の製造方法により得られた酵素液から酵素蛋白質を分離して得られる酵素剤。
5. バチルス・ズブチリス M2-4株 (FERM BP-7155) である蛋白質分解酵素生産菌。

1 / 4

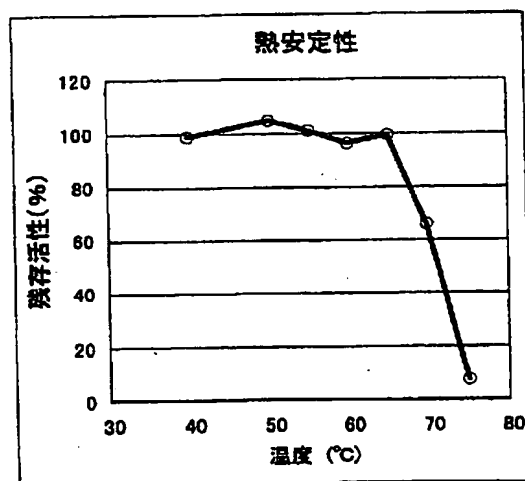
第1図

	His	Arg	Asn	Gln	Ser	Asp	Gly	Glu	Thr	Ala	Pro	Met	Val	Cys	Lys	Phe	Ile	Leu
M2-4		↑	↑	↑	↑		↑		↑	↑			↑		↑	↑	↑	↑
プロレヂン				↑	↑					↑					↑	↑		↑
プロテアーゼN									↑							↑		↑

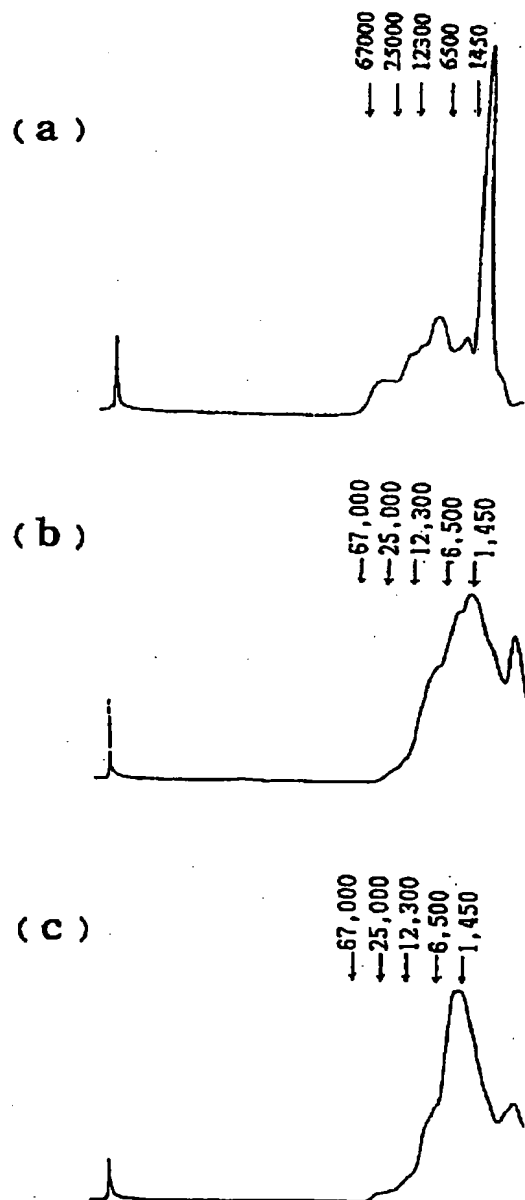
第2図



第3図



第4図



第5図

